Harnsäurepool, Harnsäureumsatz und Harnsäureausscheidung beim Gesunden unter isoenergetischer, purinfreier Formeldiät

Walter Kleiber

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534927_0017

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
München

(Direktor: Professor Dr. med. N. Zöllner)

Harnsäurepool, Harnsäureumsatz und Harnsäureausscheidung beim Gesunden unter isoenergetischer, purinfreier Formeldiät

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von

Walter Kleiber

aus

Oberaudorf

1984

Berichterstatter: Professor Dr. med. W. Gröbner

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. N. Zöllner

Dekan: Professor W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.08.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Allgemeiner Teil	2
2.1.	Endogene und exogene Harnsäure	2
2.1.1.	Einleitung	2
2.1.2.	Purinsynthese de novo	3
2.1.3.	Salvage pathway	3
2.1.4.	Abbau der Purine	4
2.1.5.	Einfluß verschiedener Purine auf Serum- und Urinharnsäurespiegel	4
2.2.	Harnsäurepool und Harnsäureumsatz	5
2.2.1.	Definition	5
2.2.2.	Harnsäureausscheidung	6
3.	Eigene Untersuchungen	8
3.1.	Problemstellung	8
3.2.	Methodik	8
3.2.1.	Versuchsaufbau	8
3.2.2.	Versuchspersonen	9
3.2.3.	Diät	10
3.2.4.	Herstellung der Injektionslösung	10
3.2.5.	Enzymatische Harnsäurebestimmung	11
3.2.6.	Harnsäureisolierung und Harnsäurereinigung	13
3.2.7.	Harnsäureaufschluß	14
3.2.8.	NH_3 - Isolierung durch Microdiffusion	15
3.2.9.	Bestimmung von Harnsäurepool und Harnsäureumsatz	16
4.	Ergebnisse	20
4.1.	Renale Harnsäureausscheidung	20
4.2.	Harnsäurepool und Harnsäureumsatz	21
4.3.	Enterale Harnsäureausscheidung	22
4.4.	Recovery der injizierten Isotope	23

5. Diskussion 24

6. Zusammenfassung 29

7. Literaturverzeichnis 45

1. Einleitung

Seit Beginn dieses Jahrhunderts ist der Harnsäurestoffwechsel Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Burian und Schur 1900 und Zöllner 1972 stellten die Bedeutung des Puringehalts der Nahrung auf den Harnsäurestoffwechsel dar. Die Untersuchungen müssen unter definierten Ernährungsbedingungen erfolgen. Die Nahrungszufuhr muß isoenergetisch sein, da Änderungen der Energiezufuhr den Harnsäurestoffwechsel beeinflussen. Die Zufuhr einer eiweißarmen und purinfreien Nahrung führt zu einer minimalen Harnsäurebildung und Harnsäureausscheidung. Benedict et al. vermuteten 1949 neben dem renalen einen extrarenalen Ausscheidungsmechanismus.

In der vorliegenden Arbeit wird in einer experimentellen Untersuchung unter einer isoenergetischen, purinfreien Formeldiät mit Hilfe der Isotopenverdünnungstechnik bei drei gesunden jungen Versuchspersonen der Harnsäurepool, die tägliche Umsatzrate des Pools, der Anteil der renalen und enteralen Harnsäureausscheidung bestimmt.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Endogene und exogene Harnsäure

2.1.1. Einteilung

Die Einteilung in exogene und endogene Harnsäure geht auf BURIAN und SCHUR, 1900, zurück. Die exogene Harnsäure bezeichnet die mit der Nahrung zugeführten Purine bzw. deren Abbauprodukt, die endogene Harnsäure umfaßt die im Körper durch Biosynthese geformte Harnsäure. BURIAN und SCHUR zeigten folgende Zusammenhänge auf: Bei einer purinfreien Nahrung unterschiedlicher Zusammensetzung übt die Nahrung keinen Einfluß auf die Harnsäureausscheidung aus. Die endogene Harnsäuremenge ist von der purinfreien Nahrung unabhängig und ist selbst bei großen Schwankungen der Kost konstant. Sie ist bei einem Individuum im wesentlichen durch dessen Lebensweise, durch den Tätigkeitszustand seines Organismus bestimmt. Zum anderen können verschiedene Individuen auch bei sehr ähnlicher Lebensweise differente endogene Harnsäurewerte besitzen. Bei der Ausscheidung von exogen zugeführten Purinen besteht kein merklicher Einfluß der Individualität, d.h. beim Menschen gelangt von exogen zugeführten Purinen etwa die Hälfte in Form von Urinharnsäure zur Ausscheidung. Bei purinhaltiger Kost summiert sich die Harnsäureausscheidung aus der Menge der endogenen Harnsäure plus etwa 60% der zugeführten Nahrungspurine. Das führt zu dem Schluß, daß sich die Muttersubstanzen der endogenen Harnsäure nicht aus den Nahrungspurinen regenerieren.

2.1.2. Purinsynthese de novo

Die Purinbasen Adenin, Guanin, Xanthin, Hypoxanthin und die Pyrimidinbasen, Cytosin, Thymin, Uracil sind die Bausteine der Ribo- und Desoxiribonucleinsäuren. Die einzelnen Purinbasen unterscheiden sich in der Substitution des Grundgerüsts des Purinringes.
Die Zelle baut den Purinring nach einem komplizierten Reaktionsmechanismus schrittweise auf, die einzelnen Atome stammen aus Amid-N des Aspartat (N1), Format (C_2/C_8), Amid-N des Glutamin (N_3/N_9), Bikarbonat (C_6), Glycin wird als ganzes Molekül eingebaut (C_4/C_5/N_7). Die Biosynthese von Purin beginnt mit der Umwandlung von Phosphoribosylpyrobphosphat (PRPP) und Glutamin zu Phosphoribosylamin. Dies ist der erste irreversible Reaktionsschritt. Das Endprodukt ist Inosinmonophosphat (IMP).

2.1.3. Salvage pathway

Die beim introzellulären Abbau von Nukleinsäuren entstehenden sowie bei der enteralen Resorption sich ansammelnden Purinbasen werden zum einen zum Endprodukt Harnsäure umgewandelt, zum anderen kommen in den Zellen Enzyme vor, die eine Reutilisation des Purinskeletts ermöglichen. So wird die Base Adenin durch das Enzym Adenin- Phosphoribosyl- Transferase (APRT) in das Nukleotid Adenosinmonophosphat (AMP) umgewandelt, die Basen Hypoxanthin und Guanin werden durch das Enzym Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyl- Transferase (HGPRT) in den Nukleotidstoffwechsel eingegliedert.
Die Möglichkeit der Weiterverwendung gewinnt dort besondere Bedeutung, wo keine Enzyme für die Biosynthese von Purinen vorhanden sind: in den Erythrozyten und im ZNS.

Eine angeborene starke Verminderung der HGPRT führt zur juvenilen Gicht. Fehlt das Enzym vollständig, kommt es zur Ausbildung des Lesch-Nyhan-Syndroms (Lesch und Nyhan 1964), das mit Choreoathetose und Selbstverstümmelung einhergeht.

2.1.4. Abbau der Purine

Der Abbau der Purine verläuft nach einer anderen Reaktionssequenz als die Biosynthese. Die einzelnen Purinriboside (Adenosin, Inosin, Xanthosin, Guanosin) werden auf verschiedenen Wegen zu Xanthin abgebaut. Dieses gemeinsame Zwischenprodukt wird durch die Xanthinoxidase oxidiert, so daß Harnsäure entsteht (das bei der Hyperuricämie verwendete Allopurinol hemmt die Xanthinoxidase und somit die Harnsäuresynthese). Bei Primaten, Vögeln und einigen Reptilien ist die Harnsäure das Endprodukt des Purinabbaus.

2.1.5. Einfluß verschiedener Purine auf Serum- und Urinharnsäurespiegel

NUGENT and TYLER (1959) waren die ersten, die den Einfluß von chemisch definierten Purinen auf den Harnsäurestoffwechsel untersuchten. Sie fügten verschiedene Dosen von Ribonucleinsäure (RNS) einer purinarmen Diät hinzu und fanden einen Anstieg der Harnsäure im Serum und Urin bei steigenden Dosen von RNS. Eine Dosis von 4 g RNS war nötig, um bei normalen Personen eine milde Hyperurikämie zu erzeugen. ZÖLLNER, GRIEBSCH und GRÖBNER fügten 1972 einer purinfreien Formeldiät Ribonucleinsäure, Desoxyribonucleinsäure (DNS), Adenosinmonophosphat (AMP), Guanosinmonophosphat (GMP), Algen-Protein hinzu:
Pro g RNS - Zulage stieg der Harnsäurespiegel im Serum um 0,9 mg/100 ml und die renale Harnsäureausscheidung um 140 mg/Tag.

Pro g DNS -Zulage stieg der Harnsäurespiegel im Serum um 0,4 mg/100 ml und die renale Harnsäureausscheidung um 68 mg/Tag.
Bei Zulagen von 5'AMP und 5'GMP lieferten die Nukleotide wesentlich mehr Harnsäure in Serum und Urin als RNS. Wenn jungen Versuchspersonen Algen als einzige Proteinquelle in Mengen verabfolgt werden, die zur Aufrechterhaltung des Stickstoffgleichgewichts nötig sind, wird der Harnsäurespiegel über die obere Normgrenze erhöht. Die unterschiedlichen Spiegel von Serum- und Urinharnsäure bei Verabreichung von verschiedenen Purinen wurde mit der Hypothese erklärt, daß RNS und DNS in ihre Nukleotide abgebaut werden müssen, bevor sie absorbiert werden. Die unterschiedliche Absoption ist auf eine unterschiedliche Geschwindigkeit des Abbaus zurückzuführen.Dies resultiert in einer renalen Ausscheidung der oral verabreichten Purine im Fall der DNS von 25%, der RNS von 50% und der Nukleotide von 80%, d.h. die Nukleotide AMP und GMP werden fast vollständig vom Darm resorbiert.

2.2. Harnsäurepool und Harnsäureumsatz

2.2.1. Definition

Als Harnsäurepool wird die Gesamtmenge der im Körper vorhandenen Harnsäure bezeichnet. Seine Größe ist einerseits abhängig von der Harnsäurezufuhr, andererseits von der Ausscheidung der Harnsäure. Die Harnsäurezufuhr gliedert sich auf in eine exogene Uratquote, die aus der Oxidation von Nahrungspurinen hervorgegangenen Harnsäure, und eine endogene Uratquote, die aus der körpereigenen Purinsynthese hervorgeht (BURIAN und SCHUR 1900 ,1903). An der Entstehung von Harnsäure als Endprodukt des Zell-

kernstoffwechsels sind sämtliche Organe in unterschiedlichem Maß beteiligt. Als Harnsäureumsatz bezeichnet man die pro Zeiteinheit durch den Pool fließende Harnsäuremenge (Harnsäureumsatz als pro Zeiteinheit umgesetzter Teil des Pools, bzw. als pro Zeiteinheit umgesetzte Harnsäuremenge).

2.2.2. Harnsäureausscheidung

Mehr als zwei Drittel der Harnsäure wird renal ausgeschieden, der Rest gastrointestinal. Die renale Ausscheidung umfaßt Filtration, tubuläre Reabsorption und tubuläre Sekretion. Die im Plasma vorhandene Harnsäure wird vollständig glomerulär filtriert. Mit Zunahme des tubulären Substratangebots erhöht sich die Reabsorption, die eine nahezu unbegrenzte Kapazität besitzt. Bei Harnsäureserumkonzentrationen von 15 mg/100 ml ist das Transportmaximum noch nicht erreicht. Die im Urin erscheinende Harnsäure entstammt deshalb vorwiegend der tubulären Sekretion. Mit zunehmender Reabsorptionsgeschwindigkeit erhöht sich auch die Sekretion. Uricosurica, die die Reabsorption von Harnsäure hemmen, verlieren ihre Wirkung nach Gabe von Medikamenten, die die Uratsekretion hemmen (Pyrazinamid, Pyrazinsäure). Die extrarenale Harnsäureausscheidung hat ihr Hauptgewicht in der enteralen Ausscheidung. Verluste über Schweiß und Speichel können vernachlässigt werden. Die Angaben in der Literatur über diesen Ausscheidungsmechanismus sind uneinheitlich. Isotopenversuche unter purinfreier Diät wurden bisher noch nicht durchgeführt.

BENEDICT et al. untersuchten 1949 den Harnsäurestoffwechsel bei drei Gesunden und zwei Gicht-Patienten mit Hilfe ^{15}N-markierter Harnsäure. Die drei gesunden Versuchspersonen wiesen einen Harnsäurepool von 1100 mg bis 1300 mg und eine Harnsäureumsatzrate von 53 - 76 Prozent des Pools pro Tag auf. Dieser Umsatz entsprach einer Harnsäuremenge von 690 - 870 mg. Obwohl sich die Versuchspersonen in einem steady state befanden, was den Harnsäurestoffwechsel betraf, wurden im Urin nur 560-620 mg Harnsäure pro Tag gefunden. Aus der Tatsache, daß gesunde Versuchspersonen mehr Harnsäure synthetisierten als diejenige Menge, die im Urin erscheint, schlossen BENEDICT et al., daß möglicherweise Verluste von Harnsäure über Darm und Schweiß bestehen, daß also ein signifikanter Teil der Harnsäure nicht renal ausgeschieden wird.

WYNGAARDEN und STETTEN untersuchten 1953 den Einfluß der bakteriellen Darmflora auf den Abbau der extrarenal ausgeschiedenen Harnsäure. Da sie keine vollständige Bakteriostase des Darmes erreicht hatten, unterschieden sich die beiden mit ^{15}N-markierter Harnsäure durchgeführten Versuchsperioden bezüglich der enteralen und renalen Harnsäureausscheidung nicht.

Erst SØRENSEN gelang es 1960 zu beweisen, daß die enteral ausgeschiedene Harnsäure durch die Darmflora abgebaut wird.

BOWERING et al. untersuchten zwei gesunde Personen, sowohl während einer purinarmen Diät als auch während einer Purinbelastung von 4 g RNS mit Isotopenverdünnungstechnik. Die zwei Personen waren gleich alt und hatten dasselbe Gewicht. Es ergab sich jedoch ein beträchtlicher Unterschied der Umsatzrate hinsichtlich der RNS-Belastung. Bei einer Person blieb die Umsatzrate nahezu gleich, während sie bei der anderen Person um vierzig Prozent anstieg (Bowering et al., 1969).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wird unter isoenergetischer, purinfreier Formeldiät das Verhalten der Harnsäure bezüglich Pool, Umsatz, renaler und enteraler Ausscheidung mit einem Isotopenverdünnungsversuch mittels stabiler Isotope untersucht. Im folgenden wird die Methodik der einzelnen laborchemischen Untersuchungsverfahren dargestellt, die erzielten Ergebnisse aufgeführt und diskutiert.

3.2. Methodik

3.2.1. Versuchsaufbau

Der Ablauf des Versuchs erstreckt sich über 16 Tage. Diese gliedern sich in eine 10-tägige Vorperiode und in eine nach der Injektion der stabilen Isotope 6-tägige Hauptperiode. In der 10-tägigen Vorperiode wird ein steady state des Harnsäurestoffwechsels erreicht, dem eine purinfreie, isoenergetische Formeldiät mit einem Kalorienbedarf bei leichter körperlicher Arbeit zugrunde liegt. Unter Beibehaltung der isoenergetischen, purinfreien Formeldiät erfolgt am elften Tag die Injektion der stabilen Isotope.

Während der Vor- und Hauptperiode wird Urin und Stuhl gesammelt, der Urin der Vorperiode in 24 Std. Portionen, der der Hauptperiode in 12 Std. Portionen. Den Sammelgefäßen ist Toluol beigesetzt. In den Urinportionen werden Harnsäurekonzentration, Kreatininkonzentration, ^{15}N- Gehalt des Gesamturins, ^{15}N- Gehalt der Urinharnsäure, im Stuhl der ^{15}N- Gehalt bestimmt.

Die Harnsäure- und Kreatininbestimmung des Urins erfolgt enzymatisch. Die ^{15}N- Geholtsbestimmung gliedert sich in folgende Punkte: Harnsäureisolierung im Urin, Harnsäurereinigung, Aufschluß der Harnsäure bzw. des Gesamturins, NH_3- Isolierung, massenspektrometrische Isotopenverhältnismessung.
Die Serumharnsäure wird in der Vorperiode jeden zweiten Tag, in der Hauptperiode täglich, die Serumkreatininkonzentration während der Vorperiode einmal bestimmt. Diese Messung erfolgt ebenfalls enzymatisch.

3.2.2. Versuchspersonen

An dem Versuch beteiligen sich 3 gesunde Personen, eine weibliche und zwei männliche, die 27 Jahre alt sind. Der Grundumsatz in Kilocalorien (Kcal) pro Tag errechnet sich aus der Körperoberfläche, die sich nach üblichen Tabellen aus Körpergröße und Körpergewicht ergibt. Es wird ein zusätzlicher Kalorienbedarf bei leichter körperlicher Arbeit zugrunde gelegt, der Grundumsatz deshalb mit dem Faktor 1,7 multipliziert.
Versuchsperson 1 ist weiblich, Versuchspersonen 2 und 3 sind männlich.

Versuchsperson 1
165 cm, 50 kg, Grundumsatz 1238 Kcal/Tag
Umsatz bei leichter Arbeit 2105 Kcal/Tag

Versuchsperson 2
174 cm, 63 kg, Grundumsatz 1595 Kcal/Tag
Umsatz bei leichter Arbeit 2711 Kcal/Tag

Versuchsperson 3
176 cm, 68 kg, Grundumsatz 1687 Kcal/Tag
Umsatz bei leichter Arbeit 2867 Kcal/Tag

3.2.3. Diät

Als Basisdiät wird eine purinfreie, eiweißarme, isoenergetische, flüssige Formeldiät verwendet, die sich aus 55 Energieprozent Kohlenhydraten, 30 Energieprozent Fett und 15 Energieprozent Eiweiß zusammensetzt. Die Kohlenhydrate werden in Form einer Oligosaccharidmischung (Maltodextrin^{R}), das Fett als handelsübliches Speiseöl (Livio^{R}) zugeführt. Als Eiweißträger dient Magermilchpulver. Die einzelnen Zutaten werden mit einem Liter Wasser angerührt. Zusätzlich wird täglich eine Kapsel eines Multivitaminpräparates (Multibionta^{R}) verabreicht. Jeder Versuchsperson wird außerdem pro Tag ein normalgroßer grüner Apfel zugebilligt.
Der Flüssigkeitsbedarf kann mit Tee, Kaffee oder Mineralwasser gedeckt werden, jedoch muß auf ein möglichst konstantes Urinvolumen geachtet werden.
Als Süßmittel steht ein handelsüblicher Süßstoff zur Verfügung.
Die Diät wird 16 Tage eingehalten, wobei innerhalb von 10 Tagen ein steady state erreicht war und am 11. Tag die Versuchsperiode mit stabilen Isotopen begann.

3.2.4. Herstellung der Injektionslösung

Es wird eine 1,3 - ^{15}N - markierte Harnsäure verwendet, die in beiden Positionen eine Anreicherung von 95 Prozent besitzt. Dies ergibt unter Berücksichtigung der natürlichen Häufigkeit eine durchschnittliche Gesamtanreicherung von 47,68 Prozent. (Sharp and Dome GmbH, München).

500 mg der markierten Harnsäure werden in 300 ml 0,8% Li_2-CO_3 aufgelöst und mit 1 molarer HCL der pH bei 8,0 gehalten. 80 - 100 ml der Verdünnung werden jeder Person i.v. injiziert. Während der Injektion werden keine Unverträglichkeitsreaktionen beobachtet. Die Injektion erfolgt mit 50 ml Spritzen, die vor und nach der Injektion gewogen werden.

Wir danken Dr. H. Krämer, Zentrale Apotheke der Universitätsklinik, für die Zubereitung der Harnsäurelösung.

Obwohl die Injektionslösung nicht hitzesterilisiert wurde und bei einem pH von 8,0 lag, kam es zu einer geringen Spontanoxidation. (Brooks und Lant, 1976)

3.2.5. Enzymatische Harnsäurebestimmung (ZÖLLNER, 1963)

Die Harnsäure weist bei einer Wellenlänge von 293 nm im Photometer eine typische Absorptionsbande auf, die das Allantoin bei dieser Wellenlänge nicht besitzt. Allantoin entsteht aus der Harnsäure durch Einwirkung des Enzyms Uricase. Gemessen wird die Extinktionsdifferenz des Serums bzw. Urins vor Uricaseeinwirkung gegen Serum bzw. Urin nach Uricaseeinwirkung. Folgende Lösungen wurden für die Bestimmung verwendet:

1) Glycin-Puffer-Gebrauchslösung
   Glycinpuffer pH 9,3 wird mit bidestilliertem Wasser 1 : 10 verdünnt.

2) Uricase-Gebrauchslösung
   Eine Ampulle Trockenuricase wird in 25 ml Glycin-Puffer-Gebrauchslösung aufgelöst.

3) Probenlösung

a) 1 ml Serum wird mit Glycin-Puffer-Gebrauchslösung auf 25 ml verdünnt
b) 0,2 ml Urin werden mit Glycin-Puffergebrauchslösung auf 25 ml verdünnt

Die Extinktionsbestimmung erfolgte mit Hilfe eines BECKMAN-Photometers (Modell 25) bei einer Wellenlänge von 293 nm mit Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke.
Der Extinktionsabfall ergibt sich aus dem Vergleich der Ansätze

2 ml Probenlösung		2 ml Probenlösung
	gegen	
1 ml Pufferlösung		1 ml Uricaselösung

Da nur einem Ansatz Uricase zugesetzt ist, muß der Extinktionsdifferenz die Eigenextinktion der Uricase (E_F) zugezählt werden.
Der Extinktionskoeffizient für die Lösung beträgt 0,0745. Unter Berücksichtigung der Verdünnungen berechnet sich die Harnsäurekonzentration nach folgender Formel:

$$\frac{(E_{HS} + E_F) \times 3 \times 25 \times 100}{0{,}0745 \times 2 \times 1000}$$

Sämtliche Untersuchungen werden als Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.6. Harnsäureisolierung und Harnsäurereinigung

Die Isolierung der Urinharnsäure erfolgt nach Johnson und Emmerson, 1972.
Der 12 oder 24 Stunden-Urin wird mit 4 M Ammoniumhydroxydlösung auf pH 10 eingestellt und bleibt danach 10 bis 15 Minuten lang stehen. Ausgefallene Phosphate werden durch Zusatz von 5 g Kieselgel und anschließendem Filtrieren entfernt. Das Filtrat wird mit Eisessig auf einen pH von 7,5 eingestellt und auf eine 40 x 2 cm große Anionenaustauschersäule (Dowex 2 x 8, Acetatform, Bio-Rad) aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 800 ml Aqua dest. erfolgt die Elution der Harnsäure mit 1000 ml 0,5 M Pyridin- Formiat-Lösung pH 4 (0,5 Mol Pyridin, 0,5 Mol Ameisensäure ad 1000 ml Aqua dest., pH-Einstellung mit konzentrierter Ameisensäure).
Die Flußrate der Säule beträgt 3 bis 5 ml/min. Dem Eluat werden 10 ml 5 prozentiges Natriumsulfat (w/v)-Hydrazinhydrat (v/v) zugesetzt, um eine Oxidation von Harnsäure zu verhindern. Anschließend erfolgt die Einengung des Eluats unter Vakuum auf ein Volumen von ca. 5 ml mit Hilfe eines Rotationsverdampfers. Unter Zusatz von 40 ml Aqua dest. fällt unter Rühren bei + 4° C Harnsäure kristallin aus.

Die Reinigung der Harnsäure erfolgt in Anlehnung an Folin, 1922.

Die Harnsäurekristalle werden in 3 bis 4 ml einer 0,73 prozentigen Lithiumcarbonatlösung gelöst. Bei tropfweisem Zusatz von 2 N Essigsäure fällt Harnsäure bei einer Temperatur von 4 bis 10° C aus. Der Überstand wird abzentrifugiert, das Präzipitat mit Aqua dest. gewaschen und der gesamte Reinigungsvorgang ein- bis zweimal wiederholt. Sind nach dem ersten

Lösen des Präzipitats in Lithiumcarbonatlösung noch gefärbte Verunreinigungen erkennbar, so können diese durch Zusatz von Aktivkohle und Filtrieren entfernt werden. Anstelle einer Lithiumcarbonatlösung und Essigsäure können Natronlauge und Salzsäure verwendet werden.
Das durch den Waschvorgang vorhandene Aqua dest. wird in einem Trockenschrank bei etwa 80° C verdampft, sodaß schließlich die kristalline Harnsäure vorliegt.

3.2.7. Harnsäureaufschluß

Der Aufschluß der isolierten und gereinigten Harnsäure erfolgt nach einer Modifikation der Kjeldahl-Methode zur Stickstoffbestimmung. Nach dieser Methode können kleine Mengen Harnsäure aufgeschlossen werden (1 bis 4 mg).
1 bis 4 mg der gereinigten und isolierten Harnsäure werden in Reagenzgläser aus Duran-Glas mit 0,4 ml konzentrierter H_2SO_4 und einer Spatelspitze Selenoxidationsgemisch nach Wieniger (E. Merck AG, Darmstadt) versetzt und solange in einem Metallblockthermostat auf 110° C erhitzt, bis vorhandenes Wasser verdampft ist. Es werden dann gleich große, wassergefüllte Reagenzgläser mit konischem Boden als Rückflußkühler aufgesetzt und die Proben auf 350° C erhitzt. Nach 8 Stunden ist die Harnsäure vollständig aufgeschlossen, was durch Titration des Stickstoffes nachgewiesen wurde. Die NH_3 - Isolierung der aufgeschlossenen Proben erfolgt durch Mikrodiffusion.

Die Gesamtstickstoffbestimmung im Urin erfolgte nach der Methode von Kjeldahl. 2 ml Urin werden mit 20 ml konzentrierter H_2SO_4, 2 g $CuSO_4$ und 10 bis 20 g K_2SO_4 8 Stunden auf 280 °C erhitzt (Hiller, 1948; Work 1972). Unter Vakuum wird das Reaktionsgemisch anschließend mit 50 bis 100 ml konzentrierter NaOH alkalisiert, der

mit Wasserdampf entweichende NH_3 wird unter Kühlung in 50 ml 0,1 N HCL aufgefangen. Es folgt eine Volumenvergrößerung mit Aqua dest. auf 100 ml. Davon wird ein Teil zur massenspektrographischen Isotopenbestimmung bei 80° C eingedampft, der andere Teil wird zur Bestimmung der gebundenen Stickstoffmenge unter Zugabe eines Indikators (pH 7) mit 0,1 N NaOH titriert.

Die Gesamtstickstoffbestimmung im Stuhl erfolgte nach der gleichen Methode wie die im Urin. Die einzelne Stuhlportion wurde mit 500 ml Aqua dest. aufgeschwemmt und mit 1 M HCL angesäuert. 6 ml des Stuhlgemisches wurden zur Stickstoffbestimmung verwendet.

3.2.8. NH_3 - Isolierung durch Mikrodiffusion

Die mit H_2SO_4 aufgeschlossenen Harnsäureproben werden unter Kühlung mit 0,5 ml H_2O verdünnt, mit 5 µl einer 0,1 prozentigen Bromkresolgrün- Indikatorlösung versetzt und mit 1,5 ml einer 40 prozentigen kalten NaOH unterschichtet. Der entweichende Ammoniak wird in 0,2 ml 0,4 N HCL gebunden, die in kleine Kunststoffbecher gefüllt ist und von der Gummikappe, mit der die Reagenzgläser sofort nach Unterschichtung mit NaOH verschlossen werden, getragen ist. In den Kunststoffbechern befinden sich 5 µl der oben genannten Indikatorlösung. Die Reagenzgläser werden 12 Stunden bei 37° C geschüttelt, dann wird der Inhalt der Kunststoffbecher quantitativ in Eppendorfgefäße (Typ 3810) überführt. Der Überschuß an HCL wird mit 2 N NaOH zurücktitriert, um die Freisetzung des molekularen Stickstoffs nach Zugabe einer kleinen Menge LiOBr zu gewährleisten. Die noch schwach saure Lösung wird anschließend in einem Trockenschrank bei 110° C eingedampft. Die ge-

schlossenen Eppendorfgefäße dienen auch der Aufbewahrung der trockenen NH_4Cl- Probe.
Die Eppendorfgefäße mit der NH_4Cl- Probe werden bei der Messung am Massenspektrometer verwendet, Die Probe wird mit einer Hypobromidlösung (0,3 - 0,5 ml) oxidiert, anschließend erfolgt die Messung.

Die Hypobromidoxidation und die massenspektrometrische Isotopenverhältnismessung (Micromass 903, Vacuum Generators GmbH, Berlin) erfolgte durch Dr. Medina, Institut für allgemeine Chemie und Biochemie der TU München, Freising-Weihenstephan.

3.2.9. Bestimmung von Harnsäurepool und Harnsäureumsatz

Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene Methoden zur Bestimmung von Harnsäurepool und Harnsäureumsatz. Bei Kenntnis einiger physiologischer Daten können diese Größen aus Serumharnsäurekonzentration, renaler Harnsäureausscheidung und Körpergewicht näherungsweise errechnet werden. Andererseits beschrieben BENEDICT et al. 1949 eine zweite Möglichkeit, die Anwendung des Isotopenverdünnungsprinzips.
Setzt man voraus, daß das Harnsäuremolekül unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) als einwertiges Anion frei durch den Extrazellulärraum diffundiert, kann seine Verteilung derjenigen des Bromidions gleichgesetzt werden. Der Bromidraum beträgt 0,234 x KG. In den Erythrozyten ist die Harnsäure in einer Konzentration nachweisbar, die ungefähr der halben Plasmakonzentration entspricht. Bei einem Plasmavolumen von 5 Prozent des Körpergewichts und einem Hämatokrit

von 45 Prozent errechnet sich der Harnsäurepool nach ZÖLLNER (1960) folgendermaßen:

$$\text{Harnsäurepool (mg)} = 0{,}254 \times \text{KG (kg)} \times \text{Plasmaharnsäure (mg/l)}$$

Die Addition von Bromidraum und halbem Erythrozytenvolumen ergibt den Harnsäureraum von 0,254 x KG, in dem die fiktive Harnsäurekonzentration gleich der Plasmakonzentration ist. Da geringe Mengen Harnsäure auch in anderen Geweben nachgewiesen werden können, wurden die mit dieser Formel berechneten Werte von ZÖLLNER (1960) als "Mindestpool" bezeichnet. Die Berechnung des Pools aus Harnsäureraum, Plasmaharnsäurekonzentration und Körpergewicht setzt einen linearen Zusammenhang zwischen Plasmakonzentration und Poolgröße voraus. Dieser wurde von SCOTT et al. (1969) mit statistischen Methoden nachgewiesen.

Die Berechnung des austauschbaren Harnsäurepools und der täglichen Umsatzrate mit Hilfe der Isotopenverdünnungstechnik wurde von BENEDICT und Mitarbeitern 1949 eingeführt. Unter der Voraussetzung, daß die Isotopenanreicherung der Körperharnsäure zu jeder beliebigen Zeit gleich derjenigen der im Urin ausgeschiedenen Harnsäure ist, läßt sich der Abfall der Urinharnsäure-Isotopenkonzentration in Form einer e- Funktion auftragen. Bei halblogarithmischer Auftragung dieses Konzentrationsabfalles gegen die Zeit, ergibt sich im steady state zwischen Harnsäurebildung und Harnsäureausscheidung eine Gerade, mit deren Hilfe man auf die Isotopenkonzentration der Körperharnsäure zur Injektionszeit (t_o) extrapolieren kann. Die Berechnung der Poolgröße erfolgt nach dem Verdünnungsprinzip.

$$a \times I_i = (A+a) \times I_o \qquad \text{oder}$$

$$A = a \times \left(\frac{I_i}{I_o} - 1 \right)$$

a = Menge der injizierten Harnsäure (mg)

I_i = Isotopenkonzentration der injizierten Harnsäure

A = Gesamtharnsäure des Körpers (Pool), mit der sich die injizierte Harnsäure mischt

I_o = Isotopenkonzentration der Körperharnsäure nach vollständiger Vermischung mit der injizierten Harnsäure

I = Isotopenkonzentration der Körperharnsäure zu jedem Zeitpunkt

a und I_i sind bekannte Größen, I_o wird durch Rückwärtsextrapolation des halblogarithmisch aufgetragenen Konzentrationsabfalles der Isotopenanreicherung der isolierten und gereinigten Harnsäure im Urin bestimmt. Die Neigung der Geraden, die Umsatzrate k, stellt den Anteil der Harnsäure im Pool dar, der täglich durch neusynthetisierte Harnsäure ersetzt wird. Die Umsatzrate k hat die Dimension Tage $^{-1}$. Zu jedem Zeitpunkt $t + dt$ ist

$$A \times (I-dI) = AI - IdA$$

oder

$$A \times (dI/dt) = I \times (dA/dt)$$

daraus folgt

$$\frac{dA/dt}{A} = k = \frac{dI/dt}{I}$$

und weiter

$$k = \frac{\ln I - \ln I_o}{t}$$

Setzt man für I diejenige Konzentration ein, deren natürlicher Logarithmus Null ist, und für t diejenige Zeit, wo die Konzentration I gemessen wurde, so erhält man als einfachste Form der Gleichung

$$k = - \frac{\ln I_o}{t}$$

Das Produkt A x k stellt den täglichen Harnsäureumsatz in mg dar. Da die beim Abbau der Körperharnsäure anfallenden Bruchstücke im menschlichen Körper nicht in nennenswertem Maß wieder zur Purinsynthese verwendet werden können, ist A x k identisch mit der Syntheserate der Harnsäure.

4. Ergebnisse

4.1. Renale Harnsäureausscheidung

Bei einer zehntägigen Vorperiode mit isoenergetischer, purinfreier Formeldiät beträgt der Serumharnsäurewert im steady state während der letzten vier Tage bei VP 1 2,8 mg/100 ml, VP 2 4,1 mg/100 ml, VP 3 3,5 mg/100 ml. Die Urinharnsäureausscheidung pro 24 Stunden während der letzten vier Tage der Vorperiode beträgt bei VP 1 237 mg/24 Std., VP 2 281 mg/24 Std., VP 3 277 mg/24 Std. (Abb. 1,2,3; Tab. 9).
Aus glomerulärer Filtrationsrate und Serumharnsäure läßt sich die pro 24 Stunden glomerulär filtrierte Harnsäure errechnen. Bei VP 1 4,7 g/24 Std., VP 2 6,6 g/24 Std., VP 3 5,9 g/24 Std..
Bei bekannter Urinharnsäureausscheidung beträgt der prozentual ausgeschiedene Anteil der filtrierten Harnsäure bei VP 1 5,1 Prozent, VP 2 4,2 Prozent und VP 3 4,7 Prozent (Tab. 3).

Tab. 1. Harnsäureclearance der drei Versuchspersonen, bezogen auf 1,73 m^2 Körperoberfläche.

Versuchsperson	1	2	3
Harnsäureclearance (ml/min)	5,9	4,5	5,5
(ml/min x 1,73)	6,6	4,4	5,2

4.2. Harnsäurepool und Harnsäureumsatz

Es wird eine Lösung von 166,7 mg/100 ml ^{15}N- markierte Harnsäure verwendet. Jeder Versuchsperson werden 80 - 100 ml Lösung intravenös injiziert. Aus der Gewichtsdifferenz der Injektionsspritze vor und nach der Injektion errechnet sich die pro Person verabrechte Menge ^{15}N - markierter Harnsäure. Die niedrigere Konzentration der Lösung, die sich aus der enzymatischen Harnsäurebestimmung ergibt, ist auf Spontanoxydation der gelösten Harnsäure im alkalischen Milieu zurückzuführen (Brooks und Lant, 1976).

Tab. 2. Eingewogene Harnsäuremenge der Injektionslösung, enzymatisch bestimmte Harnsäurekonzentration der Injektionslösung und Differenz durch Spontanoxidation.

Versuchsperson	1	2	3
eingewogene Harnsäure (mg)	162,8	130,85	126,10
enzymatisch bestimmte Harnsäurekonzentration (mg)	158,34	127,26	122,65
Differenz (mg)	3,76	3,59	3,45

Nach der zehntägigen Vorperiode werden den einzelnen Versuchspersonen an markierter Harnsäure injiziert: VP 1 158,3 mg, VP 2 127,2 mg, VP 3 122,4 mg. Im Mittel steigt dadurch die Harnsäureausscheidung pro 24 Stunden bei VP 1 um 38 mg, VP 2 um 36 mg, VP 3 um 31 mg. Die Ergebnisse der massenspektrographischen Untersuchung nach Isolierung und Aufschluß der im Urin

ausgeschiedenen, markierten Isotope (Tab. 6,7,8) werden graphisch dargestellt(Abb. 4,5,6).
Zu berücksichtigen ist die natürliche Anreicherung von 0,365 Prozent ^{15}N der Einzelprobe. Die Isotopenanreicherung der injizierten Harnsäure I_i mit 47,68% ist bekannt, Poolgröße und Umsatzrate lassen sich jeweils berechnen. Nach halblogarithmischer Auftragung des Konzentrationsabfalls der Isotopen im Urin und Extrapolation ergibt sich für I_o bei VP 1 10,38 Atomprozent-Überschuß, VP 2 8,8 Atomprozent-Überschuß, VP 3 7,2 Atomprozent-Überschuß. Nach der beschriebenen Formel ergibt sich für den Harnsäurepool VP 1 569 mg, VP 2 562 mg, VP 3 684 mg. Die Neigung der Geraden zeigt für k die Werte VP 1 -0,82, VP 2 - 0,63 VP 3 -0,66. Daraus kann für die Umsatzrate gefunden werden VP 1 467 mg/24 Std., VP 2 354 mg/24 Std., VP 3 451 mg/24 Std.. Der vollständige Umsatz des Harnsäurepools dauert bei VP 1 29 Std., VP 2 38 Std., VP 3 36 Std. (Tab. 4).

4.3. Enterale Harnsäureausscheidung

Von der täglichen Umsatzrate des Harnsäurepools, die mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode ermittelt wird, kann über den renal ausgeschiedenen Anteil auf die enterale Harnsäureausscheidung geschlossen werden. Es wird hierbei vorausgesetzt, daß die täglich ausgeschiedene Harnsäuremenge bei konstanter Poolgröße im steady state annähernd gleich bleibt. Für die enterale Harnsäureausscheidung ergibt sich ein prozentualer Anteil der täglichen Umsatzrate von VP 1 49 Prozent, VP 2 21 Prozent, VP 3 39 Prozent.

Von der injizierten ^{15}N- markierten Harnsäuremenge finden sich über die enterale Ausscheidung bei VP 1 4,7 Prozent, VP 2 22,9 Prozent, VP 3 17,5 Prozent (siehe Tab. 4).

4.4. Recovery der injizierten Isotope (Tab. 4)

Von der injizierten ^{15}N - markierten Harnsäure finden sich im Gesamturin bei VP 1 44,3 mg, VP 2 39,8 mg, VP 3 37,3 mg, im Stuhl bei VP 1 2,5 mg, VP 2 9,75 mg, VP 3 7,14 mg ^{15}N. Das entspricht einer Gesamtrecovery über 6 Tage von VP 1 88,7 Prozent, VP 2 116,9 Prozent, VP 3 92,2 Prozent.
Der prozentuale Anteil der über die Urinharnsäure ausgeschiedenen ^{15}N - Isotope beträgt gegenüber dem Gesamturin bei VP 1 60,3 Prozent, VP 2 70,4 Prozent, VP 3 56,3 Prozent.

5. Diskussion

Betrachtet man die Literatur, ergibt sich mit der Isotopenverdünnungstechnik von BENEDICT et al. für den Harnsäurepool eine Größe von 1163 ± 223 mg bei 44 gesunden Männern. Die renale Harnsäureausscheidung bei 36 dieser Personen war 468 ± 108 mg pro Tag. Bei 8 Personen wurden keine Ausscheidungsergebnisse beschrieben. Dies ist in Übereinstimmung mit den Daten von SEEGMILLER et al. (1961).
Unter einer purinfreien, isoenergetischen Formeldiät finden wir eine Harnsäurepoolgröße von 684 mg und 562 mg bei 2 männlichen Versuchspersonen. Die renale Harnsäureausscheidung beträgt 277 mg und 281 mg pro 24 Stunden. Die durchschnittliche Größe der renalen Harnsäureausscheidung bei 25 gesunden Versuchspersonen desselben Alters betrug 321 ± 89 mg pro 24 Stunden (LÖFFLER et al. 1981). Die Ergebnisse, die von SCOTT et al. (1969) berichtet wurden, lassen einen linearen Zusammenhang zwischen Harnsäurepoolgröße und renaler Ausscheidung vermuten.
Wenn man die Ergebnisse dieser Arbeit mit denjenigen der Literatur vergleicht, ergibt sich sowohl in der Poolgröße als auch in der renalen Ausscheidung ein Unterschied. Unsere Ergebnisse liegen durchwegs niedriger als in der Literatur angegeben. Diese Differenzen sind zum Teil auf eine unterschiedliche Methodik zurückzuführen. In verschiedenen früheren Versuchen wurden keine Informationen über die "purinfreie Diät" gegeben, während es bei anderen aufgrund der Beschreibung offensichtlich ist, daß bestenfalls eine purin-

arme Diät verwendet wurde, die eine ungewisse Menge an Purinen enthielt (SEEGMILLER et al 1969, SØRENSEN et al. 1960 und andere).
Es wurde von ZÖLLNER et al (1972) gezeigt, daß eine einleitende Periode von durchschnittlich 7 Tagen notwendig ist, um steady-state-Bedingungen zu erreichen, soweit Serum- und Urinharnsäure, d.h. Poolgröße der Harnsäure beteiligt sind. In den angeführten Studien wurde eine einleitende Periode von 7 Tagen oder mehr nur bei SCOTT et al. (1969) beobachtet. Wir folgern aus diesen Ergebnissen, daß bei einer purinfreien, isoenergetischen Formeldiät der Harnsäurepool um einiges kleiner ist als in verschiedenen Studien, die als purinfrei oder purinarm beschrieben wurden.

Im Gegensatz zu den männlichen Versuchspersonen ist die Größe des Harnsäurepools der weiblichen Versuchsperson innerhalb des Normbereiches der kleinen Anzahl gesunder Frauen, die bislang untersucht wurden. Die renale Harnsäureausscheidung lag bei 237 mg pro 24 Stunden (267 mg bei 1,73 m^2 Körperoberfläche), weniger als bisher bei gesunden Frauen berichtet wurde. Die Umsatzrate des Harnsäurepools betrug bei Versuchsperson 2 0,66 pro Tag und bei Versuchsperson 3 0,63 pro Tag. Das liegt den Werten von gesunden Männern, die in der Literatur beschrieben sind, sehr nahe.

Der Haupteinwand zur Isotopenverdünnungstechnik, wie sie von BENEDICT et al. eingeführt wurde, ist die Tatsache, daß die Umsatzrate, die aus dem Abfall der Isotopenkonzentration der Harnsäure berechnet wird, nicht

die des ursprünglichen Harnsäurepools ist, sondern die des "Postinjektion-Pools" A + a . Dieser Einwand ist hauptsächlich bei Versuchen mit stabilen Isotopen begründet, in denen über 200 mg (1000 mg in einem Beispiel bei WYNGAARDEN und STETTEN 1953) markierter Harnsäure pro Experiment benützt wurden. Das sind bis zu 28 Prozent der Poolgröße, eine fälschlich hohe Umsatzrate und Poolgröße dürfte daraus resultieren (ZÖLLNER, 1960).
In dem vorliegenden Versuch wurden bei Versuchsperson 1 158 mg, Versuchsperson 2 127 mg und Versuchsperson 3 122 mg markierter Harnsäure verwendet. Die errechneten Werte für k sind also falsch hoch, die tatsächliche Umsatzrate dürfte demnach etwas niedriger liegen.

Eine weitere mögliche Korrektur des Isotopenpools A erfolgt durch die Ungenauigkeit von I_o. Die Berechtigung zur Rückwärtsextrapolation auf I_o beruht auf der Annahme, daß die injizierte Harnsäure rasch in alle Flüssigkeitsräume diffundiert, sodaß die Isotopenkonzentration im Harn von Anfang an der in einer vollständig durchmischten Körperharnsäure entspricht. BISHOP et al. (1951) haben jedoch gezeigt, daß in einigen Fällen während des ersten Tages die Ausscheidung markierter Harnsäure rascher abnimmt als in den folgenden Tagen. Diese Autoren unterscheiden deshalb einen "immediate" von einem "apparent" - Pool. Wegen der Unsicherheit von I_o darf man den Poolberechnungen aus den Isotopenversuchen nur eine annähernde Genauigkeit zuerkennen. Nach der Formel (ZÖLLNER, 1960) 0,254 x KG (kg) x Plasmaharnsäure (mg/l) errechnet sich für

den Harnsäurepool VP 1 356 mg, VP 2 656 mg, VP 3 604 mg. Die Werte für VP 2 und VP 3 erreichen annähernd die aus dem Isotopenversuch berechneten Poolgrößen. Auffallend ist die Differenz bei der weiblichen VP 1. Der Serumharnsäurewert der weiblichen Versuchsperson liegt niedriger als der der männlichen. Dies, wie auch der schnellere Harnsäureumsatz, ist durch die uricosurische Wirkung der Östrogene erklärbar. Gegenüber den männlichen Versuchspersonen zeigt sich jedoch bei einer deutlich höheren Umsatzrate k der Frau, ein gegenüber den männlichen Versuchspersonen identischer renal ausgeschiedener Teil des Umsatzes. Die prozentuale enterale Ausscheidung liegt höher als bei den männlichen Versuchspersonen. Dies könnte bedeuten, daß der Mechanismus, der zu einer niedrigen Serumkonzentration bei Frauen führt, die Harnsäureausscheidung über Nieren und Darm in gleicher Weise beeinflußt, daß also möglicherweise die Östrogene die Ausscheidung der Harnsäure überall dort beeinflussen, wo diese sezerniert wird.
Die enterale Harnsäureausscheidung zeigt bei den Versuchspersonen Schwankungen. Dies entspricht Ergebnissen, die BOWERING et al. fanden. Es ist nicht möglich, wie bei der renalen Ausscheidung, eine Gemeinsamkeit zu finden. Die Menge der enteralen Ausscheidung ist bei gesunden Versuchspersonen nicht vorhersehbar. Beim Gesunden gibt der austauschbare Harnsäurepool die tatsächlichen Verhältnisse mit ausreichender Genauigkeit wieder. Beim Gichtpatienten mit Tophi ist dies jedoch nicht der Fall, da sich die Harnsäure in den Tophi niemals vollständig mit dem injizierten Isotop äquilibriert. Weiterhin wird die injizierte,

markierte Harnsäure nicht nur durch neugebildete verdünnt, sondern auch langsam mit der festen Harnsäure der Tophi ausgetauscht. Beim Gichtpatienten ist k also kein Maß für die Harnsäureneubildung allein, sondern gleichzeitig für Verteilungsvorgänge im Körper. Diese beiden Prozesse lassen sich mengenmäßig nicht gegeneinander abgrenzen (ZÖLLNER, 1960). Bei tophöser Gicht läßt sich die halblogarithmische Darstellung der Isotopenkonzentration der Urinharnsäure oftmals in zwei Komponenten zerlegen, wovon die eine einer Umsatzrate k und einer Poolgröße im Bereich derjenigen von Normalpersonen entspricht. Die zweite, flacher verlaufende Komponente ist Ausdruck des langsamen Umsatzes der in Geweben abgelagerten Harnsäure. Durch Rückwärtsextrapolation erhält man aus dieser Kurve ein kleines I_o und damit einen großen Pool.

6. Zusammenfassung

In der experimentellen Arbeit werden im Rahmen des Harnsäurestoffwechsels unter isoenergetischer, purinfreier Formeldiät mit Hilfe der Isotopenverdünnungstechnik nach BENEDICT et al. 1949, Harnsäurepool, Harnsäureumsatz, renale und enterale Harnsäureausscheidung bestimmt. Bei dieser Methode wird die Größe von Harnsäurepool und Harnsäureumsatz mit Hilfe einer einmaligen intravenösen Injektion isotopenmarkierter Harnsäure untersucht. Nach Vermischung mit der Körperharnsäure enthält letztere eine bestimmte Isotopenanreicherung, die durch den Zufluß nicht markierter Harnsäure in den Pool laufend verringert wird. Die Geschwindigkeit der Abnahme des Isotopengehalts der Körperharnsäure ist ein Maß für die Neubildung der Harnsäure.
Der Versuch gliedert sich in eine zehntägige Vorperiode, die zur Erreichung eines steady state des Harnsäurestoffwechsels notwendig ist. Dazu wird eine völlig purinfreie isoenergetische Formeldiät verwendet. Nur unter einer solchen definierten Ernährungsbedingung können bei der Untersuchung von Pool und Umsatz verläßliche Ergebnisse erzielt werden. Es schließt sich eine sechstägige Hauptperiode an, in der am ersten Tag die stabilen ^{15}N - Isotope injiziert werden und ihr Konzentrationsabfall im Urin und Stuhl gemessen wird. Dazu wird Urin in 24 Stunden- bzw. 12 Stunden- Portionen und Stuhl gesammelt. In den täglichen Urinproben erfolgt die Harnsäureisolierung und Reinigung der Harnsäure, um den Isotopengehalt der Urinharnsäure ohne Störung durch Abbauprodukte

oder Verunreinigungen bestimmen zu können, und in identischer Weise mit den Stuhlproben der Aufschluß der Harnsäure, die NH_3 - Isolierung durch Microdiffusion und die massenspektrometrische Isotopenverhältnismessung. Harnsäurepool und Harnsäureumsatz werden graphisch und rechnerisch ermittelt.
Der Harnsäurepool beträgt bei VP 1 569 mg, VP 2 562 mg, VP 3 684 mg. Damit liegt der Harnsäurepool niedriger als bisher in der Literatur beschrieben, die Größe des Harnsäurepools der weiblichen Versuchsperson bestätigt die Ergebnisse früherer Arbeiten. Für den Harnsäureumsatz ergeben sich bei VP 1 467 mg/24 Std., VP 2 354 mg/24 Std., VP 3 451 mg/24 Std.. Diese Ergebnisse liegen im Bereich der bisher ermittelten. Die renale Harnsäureausscheidung beträgt bei VP 1 237 mg/24 Std., VP 2 281 mg/24 Std., VP 3 277 mg/24 Std., Im Gegensatz zu den männlichen Versuchspersonen weist die weibliche eine geringere Ausscheidung auf als bisher bei gesunden Frauen berichtet wurde. Für die enterale Harnsäureausscheidung ergibt sich ein prozentualer Anteil der täglichen Umsatzrate bei VP 1 49 Prozent, VP 2 21 Prozent, VP 3 39 Prozent.

Tab. 3. Glomeruläre Filtrationsrate, berechnet aus Serumkreatinin und Kreatininausscheidung im Urin; glomerulär filtrierte Harnsäure und renale Harnsäureausscheidung pro Tag.

VP	1	2	3
GFR/1,73 m^2 Körperoberfl. (ml/min.)	137	107	112
Serumkreatinin (mg/100ml)	0,6	0,8	1,0
Kreatininausscheidung im Urin (mg/100ml)	86	94	129
Serumharnsäure (mg/100ml)	2,8	4,1	3,5
renale Harnsäureausscheidung (A) (mg/Tag)	237	281	277
filtrierte Harnsäuremenge (B) (g/Tag)	4,7	6,6	5,9
prozentualer Anteil (A von B)	5,1	4,2	4,7

Tab. 4. Menge der injizierten Harnsäure (a), Isotopenkonzentration der Körperharnsäure (I_o), Umsatzrate (k), Harnsäurepool (A), Zeitdauer des vollständigen Poolumsatzes (turnover) der drei Versuchspersonen.

VP	a (mg)	I_o (Atomprozent Überschuß)	k Pools/ Tag)	Turnover Zeit (Std)	A (mg)	A x k (mg/Tag)
1	158,3	10,38	-0,82	29	569	467
2	127,2	8,8	-0,63	38	562	354
3	122,4	7,24	-0,66	36	684	451

Tab. 5. Recovery der injizierten ^{15}N - markierten Isotope im Gesamturin, in der Urinharnsäure und im Stuhl der drei Versuchspersonen während der 6 tägigen Hauptperiode.

VP	Injizierte ^{15}N-Menge (mg)	A Gesamturin (mg)	B Urinharnsäure (mg)	C Stuhl (mg)	A + C Recovery (mg)	(%)
1	52,8	44,3	26,7	2,5	46,8	88,7
2	42,4	39,8	28,0	9,7	49,5	116,9
3	40,8	37,3	21,0	7,1	44,4	92,2

Tab. 6. Massenspektrometrische ^{15}N - Bestimmung der Urinharnsäure unter purinfreier Formeldiät.

Probe	^{15}N - Anreicherung (%)			Harnsäureausscheidung (mg/12h)			^{15}N - Gehalt (mg/12h)		
	VP 1	2	3	1	2	3	1	2	3
1a	8,584	7,328	5,621	200	187	155	11,50	9,11	5,69
1b	6,404	4,273	4,617	156	126	132	6,69	4,89	3,92
2a	4,301	4,273	3,332	79	158	189	2,18	4,31	3,91
2b	2,741	3,425	2,720	81	118	94	1,35	2,53	1,55
3a	1,945	2,340	2,032	195	155	190	2,15	2,14	2,22
3b	1,632	1,765	1,664	96	114	87	0,85	1,11	0,79
4a	1,110	1,451	1,281	181	181	128	0,94	1,37	0,82
4b	0,771	1,187	1,281	103	122	111	0,29	0,72	0,48
5a	0,642	0,942	0,792	151	101	181	0,28	0,41	0,54
5b	0,558	0,942	0,680	86	115	170	0,23	0,34	0,37
6a	0,525	0,680	0,649	176	232	80	0,19	0,51	0,16
6b	0,481	0,621	0,616	123	293	335	0,09	0,53	0,59

Tab. 7. Massenspektrometrische ^{15}N - Bestimmung des Gesamturins der drei Versuchspersonen, ^{15}N - Gehalt der 12 Stunden- Urine

	^{15}N - Anreicherung in %			^{15}N - Gehalt in mg/ 12 Std.		
Probe	VP 1	2	3	VP 1	2	3
1a	0,525	0,463	0,431	10,34	8,88	8,71
1b	0,454	0,420	0,409	12,29	6,27	5,42
2a	0,429	0,411	0,407	7,37	6,82	7,09
2b	0,414	0,421	0,392	3,74	4,21	3,78
3a	0,406	0,388	0,387	4,59	3,84	3,22
3b	0,383	0,379	0,382	1,77	2,31	2,59
4a	0,379	0,375	0,376	1,31	1,23	1,61
4b	0,372	0,373	0,372	0,87	1,99	0,93
5a	0,375	0,373	0,373	0,74	1,16	1,29
5b	0,371	0,369	0,372	0,64	1,72	1,10
6a	0,370	0,372	0,371	0,29	0,92	0,95
6b	0,370	0,368	0,370	0,38	0,46	0,61

Tab. 8. Massenspektrometrische ^{15}N - Bestimmung des Stuhls unter purinfreier Formeldiät; ^{15}N - Anreicherung und ^{15}N - Gehalt.

Probe	^{15}N - Anreicherung (%)			^{15}N- Gehalt (mg/Tag)		
	VP 1	2	3	1	2	3
1	---	0,492	0,461	---	4,97	3,29
2	---	---	0,418	---	---	1,55
3	0,394	0,443	---	0,75	2,86	---
4	0,413	0,403	0,418	0,59	0,47	1,17
5	0,385	0,392	0,386	0,73	1,25	0,41
6	0,372	0,369	0,380	0,43	0,20	0,72

Tab. 9. Urinvolumen und renale Harnsäureausscheidung unter purinfreier Formeldiät.

Versuchstag	Urinvolumen (ml/Tag)[a]			renale Harnsäureausschdg. (mg/Tag)[a]		
	VP 1	2	3	1	2	3
1	2050	1530	1250	274	238	283
2	1100	2100	1450	255	182	248
3	1300	1200	1500	294	290	223
4	1300	1650	1400	173	295	194
5	1500	1680	1550	230	288	176
6	1560	1700	1620	177	262	273
7	1550	1460	1550	238	230	242
8	1280	1400	1420	213	277	306
9	1240	1410	1440	137	283	319
10	1240	1280	1290	259	282	244
1a	680	620	670	200	187	155
1b	900	1040	760	159	126	132
2a	750	580	720	79	158	188
2b	580	960	910	81	118	94
3a	900	880	540	195	155	190
3b	560	780	750	96	114	87
4a	440	480	510	181	181	128
4b	850	950	1100	103	122	111
5a	560	620	720	151	101	181
5b	560	670	690	86	115	170
6a	680	460	550	176	232	80
6b	1040	720	900	123	294	335

[a] ml bzw. mg/12 h während der Hauptperiode (1a bis 6b).

Tab. 10. Einfluß der injizierten Harnsäure auf die Harnsäureausscheidung (Mittelwert) nach der Injektion

Versuchsperson	mittlere Harnsäureausscheidung im steady - state (mg/24 Std.)	injizierte Harnsäuremenge (mg)	mittlere Harnsäureausscheidung nach Injektion (mg/24 Std.)
1	237	158	276
2	280	127	316
3	277	122	308

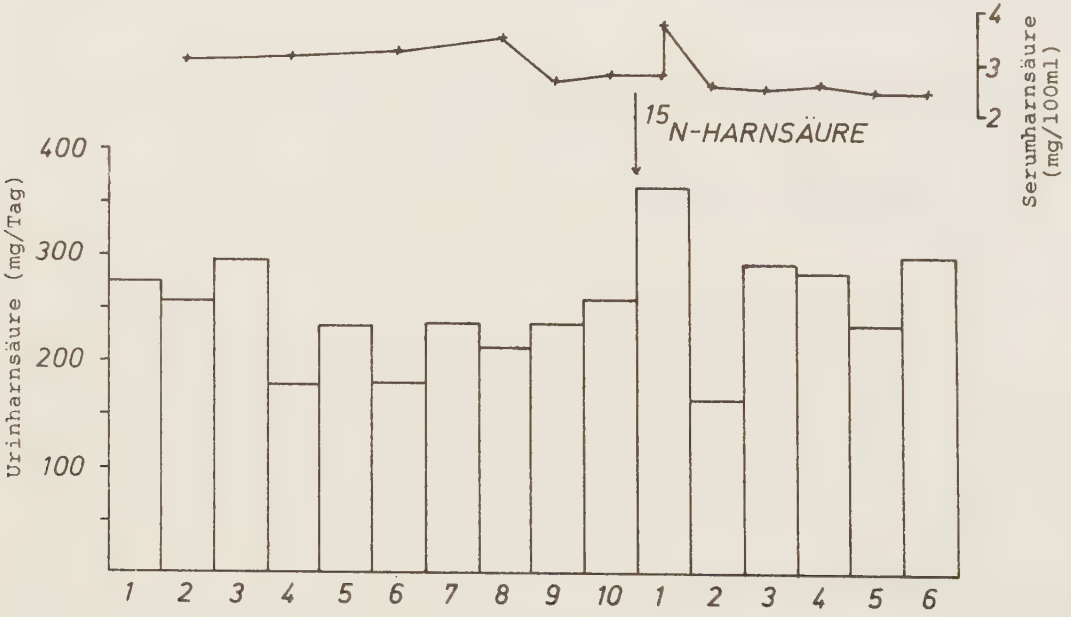

Abb. 1 Versuchsperson 1, Urinharnsäure und Serumharnsäure der Vor- und Hauptperiode unter isoenergetischer, purinfreier Formeldiät.

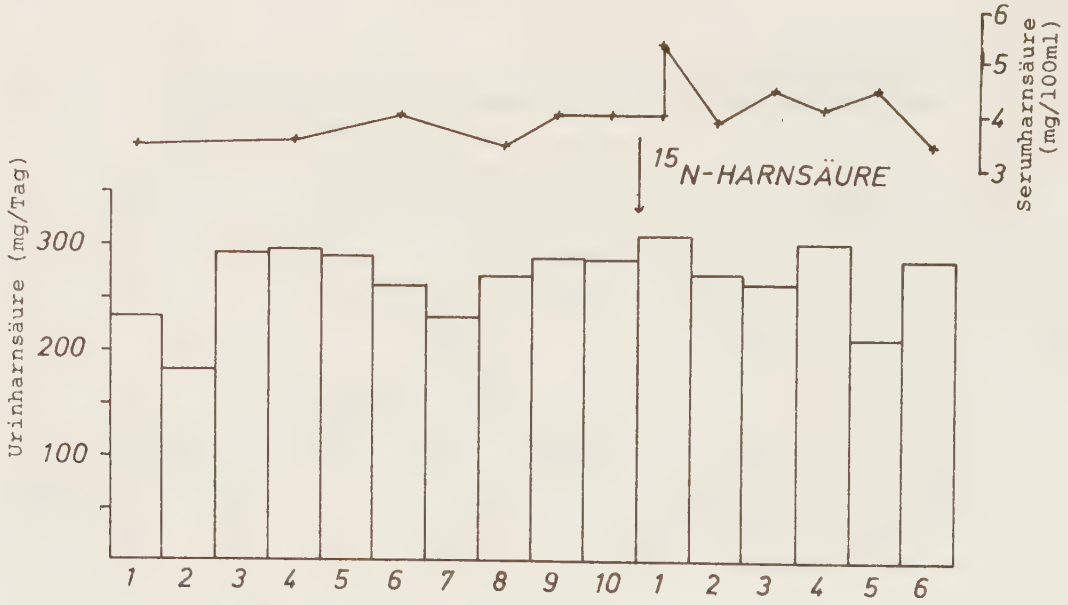

Abb. 2 Versuchsperson 2, Urinharnsäure und Serumharnsäure der Vor- und Hauptperiode unter isoenergetischer, purinfreier Formeldiät.

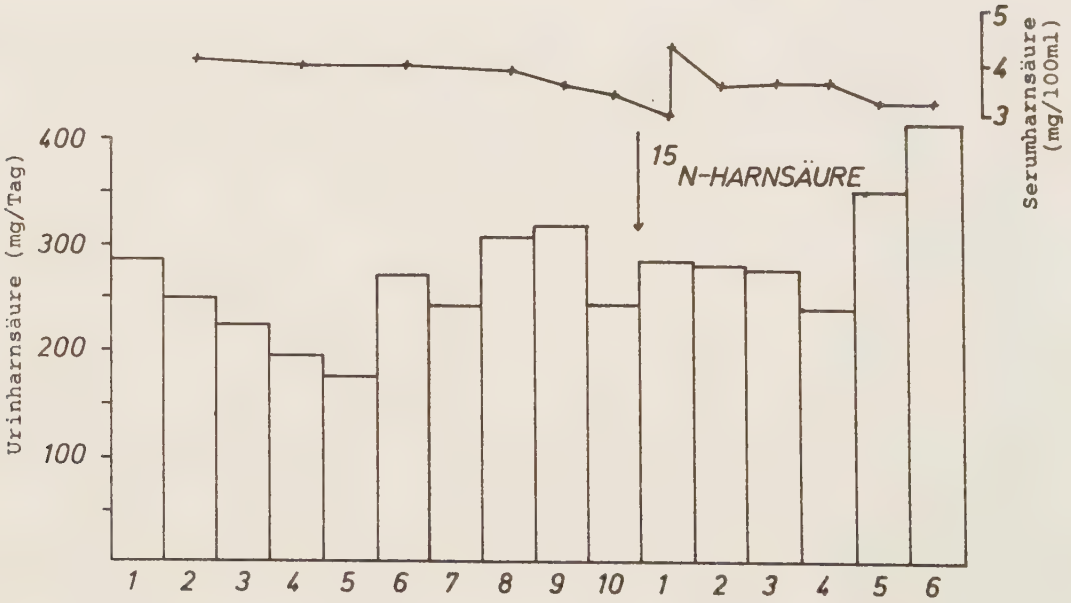

Abb. 3 Versuchsperson 3, Urinharnsäure und Serumharnsäure der Vor- und Hauptperiode unter isoenergetischer, purinfreier Formeldiät.

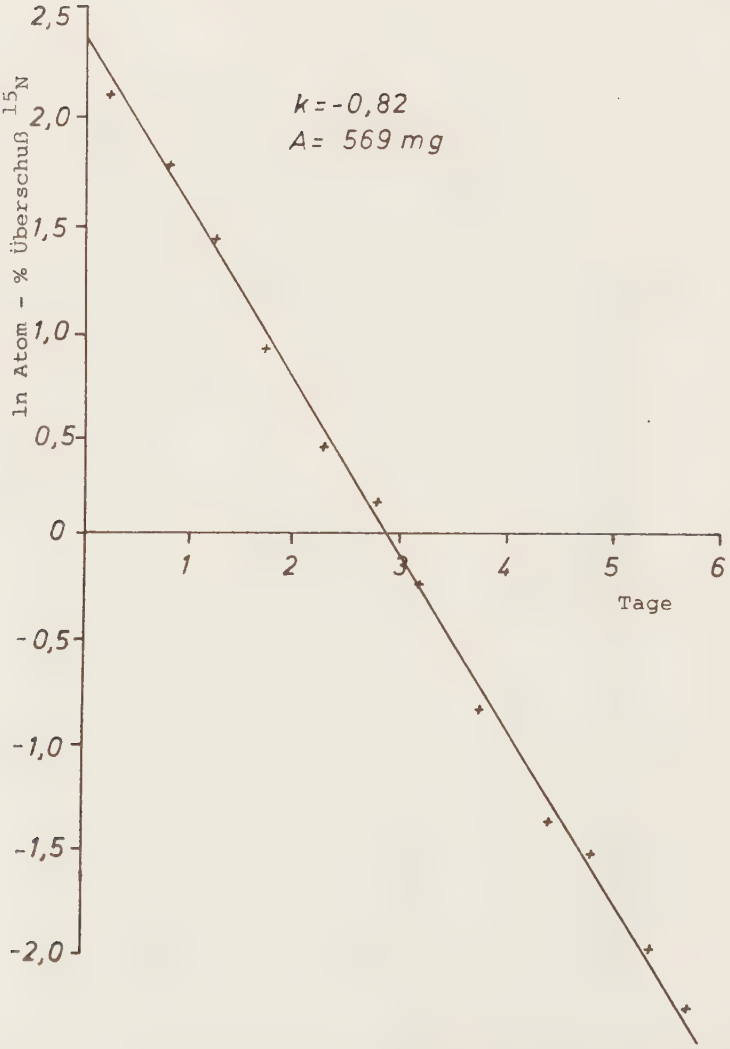

Abb. 4 Versuchsperson 1, halblogarithmische Auftragung des Atom-Prozent-Überschusses gegen die Zeit zur Ermittlung von I_o, Neigung der Geraden (k).

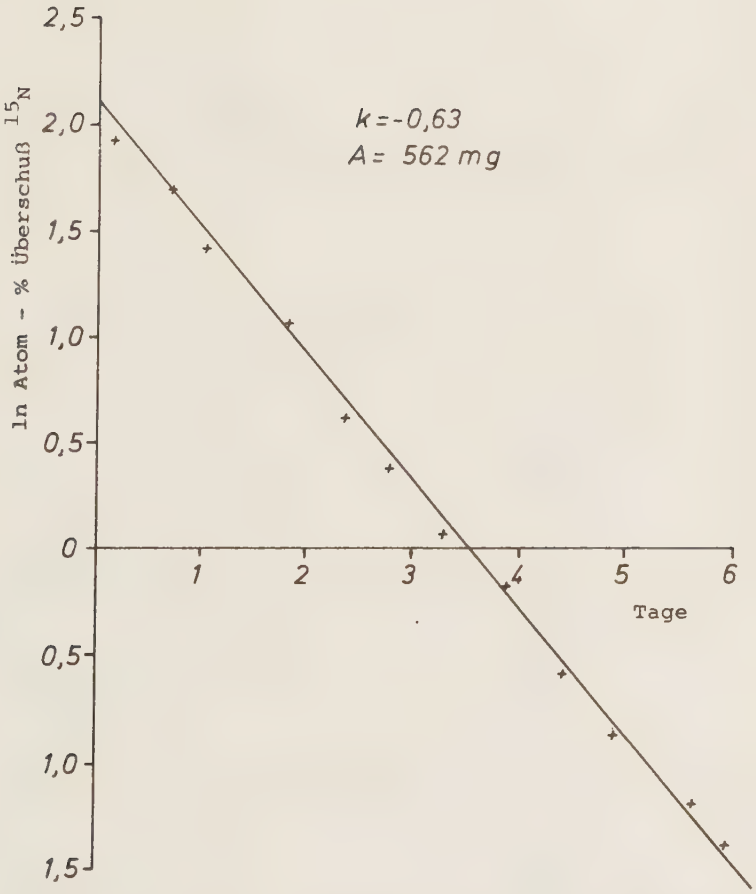

Abb. 5 Versuchsperson 2, halblogarithmische Auftragung des Atom-Prozent-Überschusses gegen die Zeit zur Ermittlung von I_o, Neigung der Geraden (k).

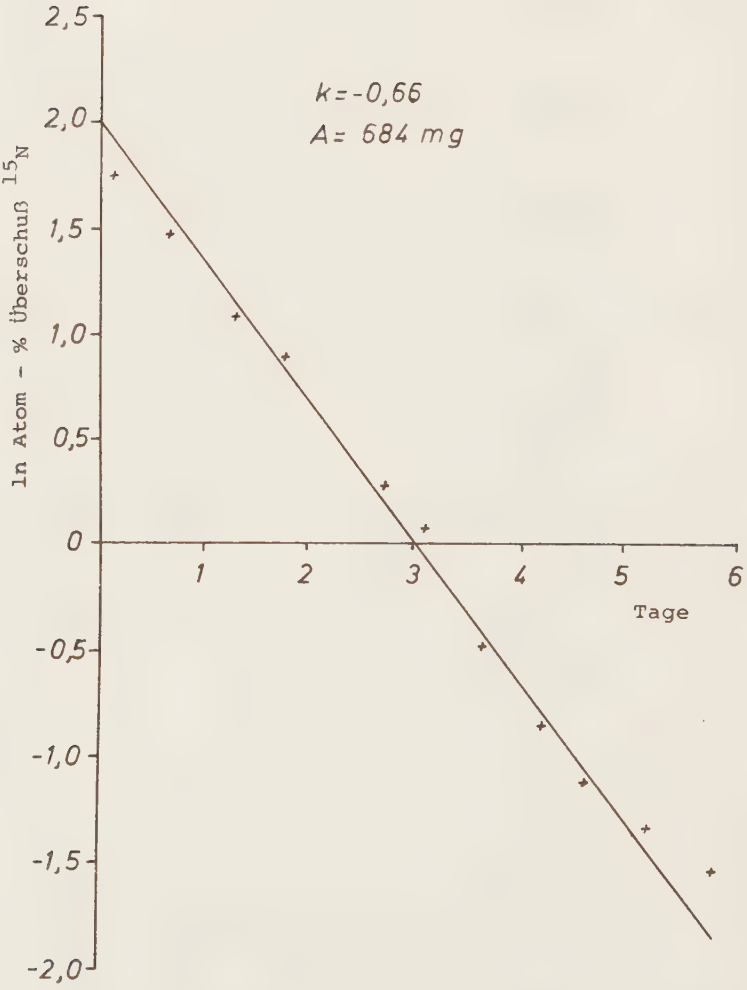

Abb. 6 Versuchsperson 3, halblogarithmische Auftragung des Atom-Prozent-Überschusses gegen die Zeit zur Ermittlung von I_o, Neigung der Geraden (k).

L i t e r a t u r

Benedict, J.D., Forsham, P.H., Stetten, D.
The metabolism of uric acid in the normal and gouty human studied with the aid of isotopic uric acid.
J. Biol. Chem. 181, 183 (1949)

Bishop, Ch., Garner, W., Talbott, J.H.
Pool size, turnover rate and rapidity of equilibration of injected isotopic uric acid in normal and pathological subjects.
J. Clin. Invest. 30, 879 (1951)

Bowering, J., Calloway, D.H., Margen, S., Kaufman, N.A.
Dietray protein level and uric acid metabolism in normal man.
J. Nutr. 100, 249 (1969)

Brooks, B.A., Lant, A.F.
Chemical instability of (2-^{14}C) uric acid in alkaline solution: the effect on observed kinetic of urate transport in human erythrocytes.
Anal Biochem 75, 640 (1976)

Burian, R., Schur, H.
Über die Harnpurinausscheidung des Menschen.
Pflüglers Archiv 80, 241 (1900)

Burian, R., Schur, H.
Über die Stellung der Purinkörper im menschlichen Stoffwechsel.
Pflüglers Archiv 87, 239 (1901)

Folin, C.
Laboratory manual of biological chemistry.
Mc Graw Hill. New York, 299 (1922)

Hiller, A., Plazin, J., van Slyke, D.
A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in protein.
J. Biol. Chem. 176, 1401 (1948)

Johnson, L.A., Emmerson, B.T.
Isolation of crystalline uric acid from urine for urate pool and turnover measurement.
Clin. Chem. Acta 41, 389 (1972)

Lesch, M., Nyhan, W.C.
A familial disorder of uric acid metabolism on central nervous system function.
Amer. J. Med. 36, 561 (1964)

Löffler, W., Gröbner, W., Zöllner, N.
Nutrition and uric acid metabolism: plasma level, turnover, excretion.
Fortschr Urol Nephrol 16, 8 (1981)

Nugent, C.A., Tyler, F.H.
The renal excretion of uric acid in patients with gout and in nongouty subjekts.
J. Clin. Invest. 38, 1890 (1959)

Scott, J.T., Holloway, V.P., Glass, J.H., Arnot, R.N.
Studies of uric acid pool size and turnover rate.
ann. rheum. Dis. 28, 366 (1969)

Seegmiller, J.E., Grayzel, A.J., Laster, L., Liddle, L.
Uric acid production in gout.
J. Clin. Invest. 40, 1304 (1961)

Sørensen, L.B.
The elimination of uric acid in man studied by means of ^{14}C - labelled uric acid.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12, Suppl 54 (1960)

Work, T.S., Work, E.
Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology 3, 356 (1972)

Wyngaarden, J.B., Stetten, D.
Uricolysis in man.
J. Biol. Chem. 203, 9 (1953)

Zöllner, N.
Moderne Gichtprobleme. Ätiologie, Pathogenese, Klinik.
Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 14, 321 (1960)

Zöllner, N., Griebsch, A., Gröbner, W.
Einfluß verschiedener Purine auf den Harnsäurestoffwechsel.
Ernährungsumschau 3, 79 (1972)

Zöllner, N.
Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung.
Z. klin. Chem., klin. Biochem. 1, (1963)

Herrn Professor Dr. med. N. Zöllner danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Medizinischen Poliklinik durchzuführen.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. W. Gröbner für die freundliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung des Versuches, sowie die Durchsicht des Manuskripts.

L e b e n s l a u f

04.06.1951	geboren in Oberaudorf, Kreis Rosenheim, Bayern
1957-1964	Volksschule Rosenheim
1964-1968	Realschule Rosenheim
1968-1973	St.-Matthias-Gymnasium, Wolfratshausen-Waldram, Bayern
1973	Reifeprüfung
1973-1974	Zivildienst im Städtischen Krankenhaus, München-Schwabing
1974-1981	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilian-Universität, München
Juni 1981	Approbation
seit Juli 1981	Kreiskrankenhaus Krumbach, Innere Abteilung